

Cosmetic and therapeutic compositions contg a haemocyanin**Publication number:** FR2741266**Publication date:** 1997-05-23**Inventor:****Applicant:** CHASSIGNOLE JEAN BERNARD (FR)**Classification:****- International:** A61K8/64; A61K38/17; A61Q17/00; A61Q19/00;
A61K8/30; A61K38/17; A61Q17/00; A61Q19/00; (IPC1-
7): A61K38/42; A61K31/47; A61K38/42**- European:** A61K8/64; A61K38/17; A61Q17/00; A61Q19/00**Application number:** FR19950013584 19951116**Priority number(s):** FR19950013584 19951116**Report a data error here****Abstract of FR2741266**

Products having a cosmetic or therapeutic effect containing one or more active materials, at least one of which is a protein (I) capable of reversibly fixing one or more oxygen molecules, are new. The protein (I) preferably carries one or more copper atoms, haemocyanins and their derivatives being especially suitable. These are prepared by known methods from the haemolymph of marine molluscs, cephalopods or gastropods

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) REPUBLIQUE FRANCAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 741 266

(21) N° d'enregistrement national : 95 13584

(51) Int Cl⁶ : A 61 K 38/42(A 61 K 38/42, 31:47)

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 16.11.95.

(30) Priorité :

(71) Demandeur(s) : CHASSIGNOLE JEAN BERNARD —
FR.

(72) Inventeur(s) :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 23.05.97 Bulletin 97/21.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : Se reporter à la fin du
présent fascicule.

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire :

(54) STIMULATION DU METABOLISME CELLULAIRE PAR UNE PROTEINE FIXANT REVERSIBLEMENT
L'OXYGENE, CELLE-CI PERMETTANT LA POTENTIALISATION DE L'ACTIVITE D'AUTRES SUBSTANCES A
VOCATION THERAPEUTIQUE OU COSMETIQUE.

(57) Stimulation du métabolisme cellulaire par une protéine
fixant réversiblement l'oxygène, celle-ci permettant la po-
tentialisation de l'activité d'autres substances à vocation
thérapeutique ou cosmétique.

La protéine qui fixe réversiblement l'oxygène est une
protéine contenant plusieurs liaisons organométalliques
dans lesquelles le métal lié est le Cuivre et qui appartient à
la famille des Hémocyanines.

Cette stimulation du métabolisme cellulaire permet la for-
mulation de préparations actives à vocation pharmaceuti-
que ou cosmétique.

L'activité de ces préparations est par exemple orientée
vers la simulation des fibroblastes du tissu conjonctif, des
mélanocytes ou kératinocytes.

Cette protéine de haut poids moléculaire, dans laquelle
les atomes de cuivre forment un complexe organométallique
qui permettant le transport de gaz dissous, peut être utili-
sée dans une préparation pharmaceutique ou cosmétique
seule ou en association avec d'autres principes actifs.

Lorsqu'elle est utilisée seule, elle produit un effet de sti-
mulation et de normalisation du métabolisme cellulaire.

Lorsqu'elle est utilisée en association avec une autre
substance active, elle normalise le métabolisme et poten-

tialise l'activité du principe actif cosmétique ou pharmaceu-
tique associé.

FR 2 741 266 - A1



5

Stimulation du métabolisme cellulaire par une protéine fixant réversiblement l'oxygène, celle-ci permettant la potentialisation de l'activité d'autres substances à vocation thérapeutique ou cosmétique.

10

La présente invention concerne le procédé de préparation d'une substance active destinée à agir sur le métabolisme cellulaire pour en stimuler l'activité.

15 La cellule est la plus petite unité de vie organisée. Elle est le siège d'échanges chimiques et gazeux permanents avec son environnement. Ces échanges se font à travers la membrane cellulaire. Grâce à cet échange, l'oxygène présent dans l'environnement peut atteindre une protéine appelée cytochrome C oxydase qui réduit l'oxygène en formant de l'eau et permet simultanément la phosphorylation d'une molécule d'adénosine diphosphate. Ce mécanisme de respiration cellulaire s'effectue au niveau des mitochondries qui constituent le « moteur » de chaque cellule.

20 De nombreuses publications ont démontré qu'au cours du vieillissement de la cellule, sa capacité à prélever et à utiliser l'oxygène diminuait progressivement et que son métabolisme se ralentissait proportionnellement. Nous savons que la rigidification progressive de la membrane cellulaire modifie les phénomènes de diffusion passive à travers cette membrane qui devient imperméable. La cellule perd progressivement ses relations avec 25 son environnement, son métabolisme se ralentit et elle devient une cellule vieillissante.

30 L'objet de l'invention est de permettre à la cellule de limiter les conséquences de ce vieillissement grâce à une préparation permettant : - de restaurer une perméabilité membranaire suffisante, - de rétablir les échanges gazeux et lui apporter une quantité d'oxygène nécessaire à sa respiration, - fournir les éléments indispensables au redémarrage de son métabolisme.

35 Selon les caractéristiques de l'invention, la préparation active est élaborée à partir d'une matière première disponible dans la nature et qui est restée jusqu'à nos jours inexploitée dans le domaine concerné par la présente invention.

40 Un des composants de la préparation active est une protéine obtenue par purification de l'hémolymph. L'hémolymph est le tissus liquide qui permet aux animaux à sang froid (mollusques marins, arachnidés...) de transporter l'oxygène nécessaire à leur respiration. Il s'agit de l'homologue de l'hémoglobine des vertébrés supérieurs à respiration aérienne, contenue dans les hématies ou globules rouges.

45 La comparaison des propriétés de l'hémoglobine et de l'hémolymph permet de dégager les points essentiels suivants :

- Dans l'hémoglobine, le complexe capable de fixer de façon réversible l'oxygène contient un atome de Fer alors que dans l'hémolymph, l'hème est constituée d'un noyau de Cuivre.
- La capacité de l'hémolymph à fixer l'oxygène réversiblement est très supérieure à celle de l'hémoglobine.
- La masse moléculaire de la protéine qui entoure l'hème dans l'hémoglobine est de 65 000 Dalton environ
- 50 La masse moléculaire de l'hémolymph est de 900 000 Dalton environ

55

Description d'une molécule d'hémolymphé :

La structure de l'hémocyanine est connue, notamment grâce à la description de C. Bonaventura, J. Bonaventura et B. Sullivan dans la publication « Hemoglobins and Hemocyanins, comparative aspects of structures and functions », J. Exp. Zool. 194, 155-174 (1975).

Une molécule d'hémocyanine est constituée de 8 à 12 monomères, chacun d'eux ayant un site actif pouvant fixer réversiblement l'oxygène.

10 Le site actif est constitué de deux atomes de cuivre liés directement à la protéine par 6 histidines. L'hémocyanine ne comporte pas de structure analogue à l'hème qui porte l'atome métallique dans l'hémoglobine. Comme pour l'hémoglobine, l'hémocyanine passe de l'état oxyhémocyanine en présence d'oxygène à l'état désoxyhémocyanine lorsque le gaz carbonique remplace l'oxygène.

15 Les atomes de cuivre passent l'état cuivrique à l'état cuivreux, le spectre d'absorption de la molécule passe de 340 nm à 280 nm.

Procédé d'extraction et de purification de l'hémocyanine

20 De nombreux organismes marins possèdent une hémolymphé riche en hémocyanine. L'hémocyanine peut être extraite de mollusques, de céphalopodes ou de gastéropodes. Chaque espèce possède une hémocyanine dont l'affinité pour l'oxygène (P_{50} mm Hg) varie de 10 à 120.

25 L'extraction et la purification de l'hémocyanine fait appel à des techniques connues du domaine de la chimie et de la biochimie. Une succession d'étapes comportant une hydrolyse ménagée enzymatique ou chimique, des filtrations, ultrafiltrations et dialyses permettent l'élimination de toutes les structures moléculaires indésirables et les sous produits de faible poids moléculaire. La solution de couleur bleutée contenant la protéine est concentrée jusqu'à ce que le dosage en matières protéiques soit compris entre 0,2 % et 10 %, de préférence entre 2 % et 5%. La valeur protéique est évaluée par la technique du Kjeldahl ou par la technique de Lowry.

30 Le dosage du cuivre est effectuée par absorption atomique. La solution est ensuite stabilisée chimiquement, notamment pour ce qui concerne ses propriétés acido-basiques avec des neutralisants qui sont bien connus de la technique chimique et qu'il n'est pas utile de citer ici.

35 La solution ainsi obtenue que nous appellerons solution A entre dans la composition de substances actives préparées selon l'invention à des fins thérapeutiques ou cosmétiques.

40 La solution A qui répond aux caractéristiques définies précédemment peut être utilisée dans le but de normaliser le métabolisme cellulaire. Cette propriété est aisément vérifiable grâce à un test permettant d'évaluer la quantité d'ATP synthétisée par une culture cellulaire mise au contact de la solution A par comparaison avec la même culture non traitée par la solution A. Dans le cas de la culture cellulaire traitée par la solution A, la quantité supplémentaire d'ATP synthétisée est très significative, ce qui traduit une stimulation importante du métabolisme cellulaire.

45 L'objet de l'invention est de mettre à profit la réactivation du métabolisme cellulaire dans le but de préparer des compositions actives pharmaceutiques ou cosmétiques qui permettront de remédier à l'affaiblissement ou au défaut d'activité de certaines cellules spécialisées.

50 Les compositions actives sont préparées indifféremment à partir de la solution A seule, ou à partir de la solution A à laquelle on ajoute un ou plusieurs principes actifs connus pour leurs propriétés pharmaceutiques ou cosmétiques. Dans ce dernier cas, le rôle de l'hémocyanine est de potentialiser l'effet de la substance active complémentaire. Cette propriété est notamment intéressante car elle peut permettre d'éviter un surdosage inutile ou parfois même nocif de la substance susceptible d'exercer un effet cosmétique ou thérapeutique.

Les substances actives complémentaires peuvent être de nature très différentes. Les compositions suivant l'invention peuvent contenir des vitamines, des hormones, des enzymes, des vasodilatateurs, des vasoconstricteurs, anti-inflammatoires, antiseptiques, anti-allergiques, neuroleptiques...

5 La préparation de la composition suivant l'invention peut être réalisée sous forme de lotion, d'émulsion, de gel ou de toute autre forme galénique pouvant être administrée par voie orale, par injection ou par voie transcutanée.

10 La vocation de ces préparations peut être par exemple de ralentir le vieillissement du tissus conjonctif cutané, la normalisation de l'hydratation de l'épiderme, l'inhibition de la formation de radicaux libres au sein du derme, l'augmentation de la capacité des mélanocytes à synthétiser la mélanine ou bien l'augmentation de la quantité de kératine synthétisée par les kératinocytes.

Les traitements envisagés pourront avoir un aspect préventif ou curatif.

15

EXEMPLES : L'invention est illustrée de façon non limitative par les exemples qui suivent.

20 **Exemple 1**

Produit cosmétique réhydratant.

Cet exemple décrit le rôle de l'eau liée à l'hémocyanine. La molécule d'hémocyanine comporte un grand nombre de sites polaires qui retiennent l'eau dans une sphère d'hydratation.

Dans 100 g d'une émulsion Huile dans eau on introduit :

25 - 2 g de solution d'hémocyanine répondant aux caractéristique définies précédemment (solution A),
 - 2 g d'une solution d'urée à 20%
 - 2 g d'une solution de hyaluronate de sodium à 10%
 - 1 g de glycérine

30 La préparation apporte un effet hydratant prolongé. Les mesures de résistivité au cornéomètre montrent une hydratation beaucoup plus importante qu'avec une émulsion ne comportant pas d'hémocyanine.

Exemple 2

Produit cosmétique régénérant pour la peau.

35 Cet exemple décrit le rôle de l'hémocyanine pour la stimulation des fibroblastes qui ont la charge de la synthèse de l'élastine et du collagène. Le tissus conjonctif dermique devient plus souple et plus tonique.

Dans 100 g d'une émulsion huile dans eau on introduit :

40 - 2 g de solution d'hémocyanine répondant aux caractéristique définies précédemment (solution A),
 - 2 g d'une solution d'hydrolysat d'élastine à 4%
 - 2 g d'une solution d'hydrolysat de collagène à 4%

Une application journalière de cette préparation permet de donner une plasticité et une tonicité plus importante à la peau.

45 **Exemple 3**

Produit analgésique.

Cet exemple décrit l'aptitude de la solution d'hémocyanine à favoriser les échanges

Dans 100 g d'un pommade molle on ajoute

50 - 2 g de solution d'hémocyanine répondant aux caractéristique définies précédemment (solution A),
 - 2,5 g de glafénine
 - 4 g de polyvinyl-pyrrolidinone

Il suffit d'une mince couche appliquée sur la peau pour calmer la douleur sans obligation d'ingestion d'analgésiques per os.

55

60

Exemple 4**Produit cosmétique activateur de bronzage.**

5 Cet exemple décrit l'intérêt de l'utilisation de l'hémocyanine dans le processus de synthèse de la mélanine. Les atomes de cuivre liés à la protéine jouent le rôle de catalyseur de la transformation de la tyrosine en mélanine.

Dans 100 g d'un lait pour application cutanée on ajoute

- 2 g de solution d'hémocyanine répondant aux caractéristique définies précédemment (solution A),
- 2,5 g de tyrosine
- 2 g d'un dérivé cinnamique ou acide hydroxy-2 méthoxy-4 benzophénone-5 sulfonique jouant le rôle d'absorbeur d'UV
- 1 g de salicylate d'éthyle-2 hexyle

Le bronzage est plus rapide et plus intense. La production de mélanine qui s'effectue normalement 48 heures après la première exposition au soleil est plus rapide. La préparation permet d'augmenter le seuil minimal érythémateux.

Exemple 5**Produit cosmétique cicatrisant.**

20 Cet exemple décrit l'activité de l'hémocyanine en combinaison avec un agent cicatrisant.

Dans 100 g d'une microémulsion eau dans huile on ajoute

- 2 g de solution d'hémocyanine répondant aux caractéristique définies précédemment (solution A),
- 0,2 g de digluconate de chlorhexidine,
- 2 g de solution d'hydrolysat d'élastine,
- 1 g de lactate d'ammonium

La cicatrisation est rapide, grâce à la stimulation des fibroblastes on remarque la présence d'élastine et de collagène au niveau du cône cicatriciel. La cicatrisation se fait sans formation du bourrelet cicatriciel ou chéloïde.

Exemple 6**Lotion cosmétique favorisant la croissance des phanères.****Cet exemple décrit la stimulation des kératinocytes par l'hémocyanine.**

25 Dans 100 g de lotion capillaire on introduit

- 5 g de solution d'hémocyanine répondant aux caractéristique définies précédemment (solution A),
- 1 g de méthionine
- 1 g de cystéine
- 2 g d'une solution d'hydrolysat de kératine
- 1 g de minoxidil

40 L'application de cette lotion sur le cuir chevelu stimule les bulbes capillaires et favorise la croissance des cheveux. Des résultats appréciables sont obtenus pour ralentir la chute des cheveux. Dans certains cas, il est possible de favoriser la repousse.

Exemple 7**Gel cosmétique anti-radicaux libres.**

Le gel est composé d'une dispersion de carboxyméthyl cellulose dans laquelle on ajoute 2% de solution d'hémocyanine répondant aux caractéristique définies précédemment (solution A).

50 Cet exemple décrit l'action de l'hémocyanine sur une culture cellulaire de fibroblastes.

La culture cellulaire est séparée en deux lots. Un lot servant de témoin, l'autre traité par le gel contenant de l'hémocyanine.

Le dosage du malonaldéhyde, dernier élément issu de la destruction des protéines par les radicaux libres est dosé.

Dans le lot non traité, il apparaît que la quantité de malonaldéhyde dosé est 4,5 fois plus importante que dans le lot traité.

Revendications

10 1° - Produit pour applications cutanées à effet cosmétiques et/ou thérapeutiques renfermant une ou plusieurs substances actives, caractérisé en ce que l'une des substances actives est constitué d'une protéine capable de fixer réversiblement une ou plusieurs molécules d'oxygène.

15 2° - Produit suivant la revendication 1, caractérisé en ce que la protéine comportant un ou plusieurs atomes de cuivre liés à la protéine pour former une liaison de type organométallique et capable de fixer reversiblement l'oxygène.

20 3° - Produit suivant les revendications 1 et 2, caractérisé en ce que la protéine contenant les atomes de cuivre est connue sous la dénomination hémocyanine ou dérivé d'hémocyanine.

25 4° - Produit suivant les revendications 1 à 3, caractérisé par son aptitude à stimuler le métabolisme cellulaire et à potentialiser l'effet des autres substances actives de la préparation.

5° - Produit suivant les revendications 1 à 4 caractérisé par son activité sur la normalisation du métabolisme cellulaire et capable de stimuler la synthèse d'élastine, de collagène, de mélanine, kératine et de toute autre substance constitutive du tissu conjonctif.

30 6° - Produit suivant les revendications 1 à 4 caractérisé par son activité sur le tissu conjonctif seul ou en association avec un principe actif destiné à agir sur la normalisation cellulaire.

7° - Préparation active à vocation cosmétique ou pharmaceutique comprenant une protéine de haut poids moléculaire et dans laquelle les atomes de cuivre sont liés à la protéine pour former un complexe organométallique permettant le transport d'oxygène

35 8° - Potentialisation de l'activité d'un principe actif cosmétique ou pharmaceutique par association de ce principe actif avec une solution d'hémocyanine.

RAPPORT DE RECHERCHE

PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2741266

N° d'enregistrement
national

FA 522089

FR 9513584

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée										
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes											
X	FR-A-2 641 463 (SEDERMA) 13 Juillet 1990 * page 2, ligne 1 - page 3, ligne 21; revendication 1 * -----	1,3,7										
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL.6)										
		A61K										
2	Date d'achèvement de la recherche	Examinateur										
	20 Juin 1996	Voyiazoglou, D										
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES <table border="0"> <tr> <td>X : particulièrement pertinent à lui seul</td> <td>T : théorie ou principe à la base de l'invention</td> </tr> <tr> <td>Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie</td> <td>E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.</td> </tr> <tr> <td>A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général</td> <td>D : cité dans la demande</td> </tr> <tr> <td>O : divulgation non-écrite</td> <td>L : cité pour d'autres raisons</td> </tr> <tr> <td>P : document intercalaire</td> <td>& : membre de la même famille, document correspondant</td> </tr> </table>			X : particulièrement pertinent à lui seul	T : théorie ou principe à la base de l'invention	Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie	E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.	A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général	D : cité dans la demande	O : divulgation non-écrite	L : cité pour d'autres raisons	P : document intercalaire	& : membre de la même famille, document correspondant
X : particulièrement pertinent à lui seul	T : théorie ou principe à la base de l'invention											
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie	E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.											
A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général	D : cité dans la demande											
O : divulgation non-écrite	L : cité pour d'autres raisons											
P : document intercalaire	& : membre de la même famille, document correspondant											